野蚕黑卵蜂寄主识别利它素的纯化及氨基酸组成分析

高其康，胡　萃
（浙江大学应用昆虫学研究所，杭州　310029）

摘要：针对利它素特殊的物理及化学性质，采用特定的温度分离方法，成功地从野蚕 *Theophila mandarina* 和家蚕 *Bombyx mori* 的雌蛾性附腺中分别获得了纯度较高的野蚕黑卵蜂 *Telenomus theophilae* 寄主识别利它素。对这两种利它素氨基酸组成的分析表明，来自家蚕和野蚕雌蛾性附腺的利它素在氨基酸的组成和含量方面非常相似，在检测到的 15 种氨基酸中，甘氨酸、谷氨酸和天冬氨酸的克分子百分数在 10% 以上。从家蚕得到的分别为 28.1%、18.5% 和 12.6%。从野蚕得到的分别为 24.4%、18.1% 和 10.1%。这 3 种氨基酸之和在家蚕和野蚕中均超过 50% 以上。用凝胰乳蛋白酶对这两种利它素进行水解时发现溶液中均产生非水溶性沉淀，电泳表明沉淀的多肽蛋白分子量在 10 kD 左右。这显示在野蚕和家蚕利它素结构中，有着与家蚕丝蛋白相类似的结构，存在着结晶区域（沉淀）和无定形区域（上清）。

关键词：野蚕；家蚕；野蚕黑卵蜂；利它素；分离；氨基酸组成
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）03-0313-05

Fast isolation and amino acids analysis of an egg recognition kairomone of *Telenomus theophilae* from *Theophila mandarina* and *Bombyx mori*

GAO Qi-Kang，HU Cui（Institute of Applied Entomology，Zhejiang University，Hangzhou　310029，China）

Abstract：Based on the special physical characteristics of an egg recognition kairomone protein of *Telenomus theophilae*，a simple，practical，and effective technique（temperature approach）was used to purify the kairomone proteins from *Bombyx mori* and *Theophila mandarina*. The compositions of amino acids in kairomone proteins of female accessory glands were very similar between the two moths. Molar percentages of glycine，glutamic and aspartic acid of 15 amino acids detected exceeded 10% in both moths：28.1%，18.5% and 12.6%，respectively，in *B. mori*，and 24.4%，18.1%，and 10.1%，respectively，in *T. mandarina*. The total amount of these three amino acids exceeded 50% in both moths. Hydrolyzed by chymotrypsin，the polypeptides of the *B. mori* kairomone protein formed a water-insoluble precipitate. The molecular weight of the polypeptides was about 10 kD as judged by SDS-PAGE. This result suggests that the primary structures of the kairomone protein and silk protein from *B. mori* are similar，both containing a crystalline（precipitate）and a amorphous（supernatant）region.

Key words：*Theophila mandarina*；*Bombyx mori*；*Telenomus theophilae*；kairomone；isolation；amino acid composition

野蚕黑卵蜂 *Telenomus theophilae* 是桑树主要害虫——野蚕 *Theophila mandarina* 卵期的优势寄生天敌（胡萃等，1992），它对寄主卵的识别非常严格，能准确无误地找到并寄生野蚕产出的卵（Gao *et al.*，1995），而对从野蚕卵巢中解剖得到的侧输卵管卵的识别率明显低于产出卵，但当侧输卵管卵涂上野蚕雌蛾性附腺内容物后其野蚕黑卵蜂的识别率又明显升高，已明确野蚕黑卵蜂识别寄主卵与野蚕雌蛾性附腺中存在的蛋白质利它素密切相关。同时研究还表明，野蚕黑卵蜂之所以能在实验室内寄生其非天然寄主家蚕 *Bombyx mori* 卵，是因为家蚕卵表面同样存在一种能引诱野蚕黑卵蜂的利它素，其来源和性质与野蚕的非常相似（高其康和胡萃，1995）。这为在实验室内进一步深入研究野蚕黑卵蜂寄主识别利它素提供了很好的研究材料。作者（高其康和胡萃，2000）曾发现 0℃以下贮存能引起利它素产生凝集沉淀，但这并不影响其对野蚕黑卵蜂的引诱活性。作者在已有研究的基础上，进一步对该利它素的氨基酸组成特性进行研究，以探明利它素的特殊物理性质，这对野蚕黑卵蜂寄主识别利

基金项目：国家自然科学基金（30070515）、浙江省自然科学基金（398255，300304）和浙江省教委资助项目
第一作者简介：高其康，男，1962 年 2 月生，博士，副研究员，从事昆虫生理生化与分子生物学研究，E-mail：qkgao@zju.edu.cn
收稿日期 Received：2001-01-21；接受日期 Accepted：2001-05-10

它素的分子生物学研究及其相关基因克隆具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

野蚕茧采自浙江省德清市郊，家蚕蛹由本校蚕蜂系提供，品种为丰交 54A。各取刚羽化的野蚕和家蚕雌蛾 20 头，在冰台上解剖得其性附腺，用剪刀将性附腺从贮存部和分泌部交界处剪开，贮存部进行利它素粗提液提取，分泌部置于 – 70℃保存。

1.2 方法

1.2.1 粗提液提取：左手用镊子夹住贮存部近分泌部端，悬在 1.5 mL Eppendorf 管上，右手用剪刀剪开贮存部近中输卵管端，使贮存部内的附腺分泌物自然流入 Eppendorf 管内。在收集的附腺分泌物中加入等体积灭菌无离子水，混匀后 8 000 r/min 离心 5 min，收集的上清液即为利它素粗提液，4 ℃保存备用。

1.2.2 利它素快速分离：取 4 ℃中保存 1 周的粗提液，置 – 20 ℃中再保存 24 h 后取出，室温化冰后 8 000 r/min 离心 10 min；用灭菌无离子水漂洗沉淀 2 次，将沉淀一分为二，一份加乙醇脱水，室温干燥，供氨基酸组成分析用；另一份加适量 8 mol/L 脲溶液后 37 ℃使其完全溶解，并用无离子水适当稀释后进行纯度检验和结构分析。

1.2.3 利它素纯度检验：取 20 μL 待分析利它素，加 5 μL 上样缓冲液，变性后加样到 7.5% SDS-PAGE 不连续电泳胶上。分析样在浓缩胶时的电压为 100 V，在分离胶时的电压为 30 V。电泳结束后的胶在考马斯亮蓝 R-250 中染色。

1.2.4 利它素的氨基酸组成分析：氨基酸分析所需的试剂和设备由浙江大学饲料研究所提供并帮助测定，型号为德国 KNAUER – 830 型氨基酸分析仪。

1.2.5 利它素的凝胰乳蛋白酶解分析：取 – 20 ℃下保存的利它素沉淀物，加入 8 μL 凝胰乳蛋白酶和 10 mmol/L Tris•Cl（pH 7.8）792 μL，使酶终浓度为 200 μg/mL，40℃下酶解 10、16、24、36 和 48 h，各吸取酶解混合液 100 μL，8 000 r/min 离心 10 min，用水漂洗沉淀 3 次，沥净水后再加入适量 8 mol/L 脲溶液使其充分溶解，并进行电泳分析。电泳采用 Bio-Rad 微型蛋白凝胶电泳系统中微型胶（10 cm × 6 cm × 0.75 cm）。分离胶浓度为 12%，浓缩胶为 5%，电泳条件同上。

2 结果

2.1 利它素的快速分离

利它素快速分离法能从粗提液中分离纯化出对野蚕黑卵蜂有很强生物活性的组份，生物测定结果表明野蚕黑卵蜂对涂有 – 20℃下沉淀的人造卵的达 70.33%，与对照（76.67%）相比无明显差异（高其康和胡萃，2000），经 SDS-PAGE 电泳分析表明用此方法分离纯化的利它素无论是家蚕的，还是野蚕的，均为一条带，相对分子质量大于 200 kD（图 1）。

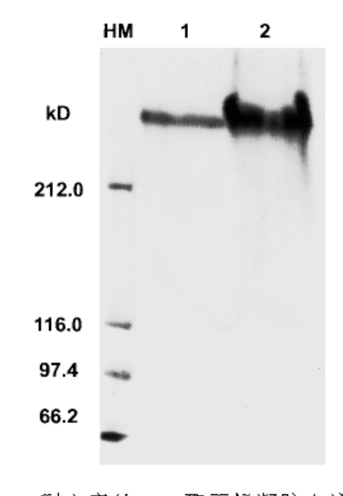


图 1 利它素的 SDS 聚丙烯凝胶电泳图

Fig. 1 SDS polyacrylamide gel electrophoresis of kairomone

HM. 高分子量蛋白质标准 high protein marker（Promega）；1. 源于家蚕 from *B. mori*；2. 源于野蚕 from *T. mandarina*

2.2 利它素氨基酸组成

利它素快速分离法纯化得到的家蚕和野蚕利它素经氨基酸组成分析，结果表明两者在氨基酸的组成和含量方面均很相似（图 2 和图 3）。共检测到氨基酸 15 种，其中在利它素分子中所占克分子百分数在 10% 以上的有甘氨酸、谷氨酸和天冬氨酸。这 3 种氨基酸含量在家蚕中分别为 28.1%、18.5% 和 12.6%，在野蚕中分别为 24.4%、18.1% 和 10.1%（表 1）。这 3 种氨基酸含量之和在家蚕和野蚕中均超过 50% 以上，分别为 59.2% 和 52.6%。

2.3 利它素凝胰乳蛋白酶酶解

用凝胰乳蛋白酶对纯化的利它素进行水解时，随着水解时间的延长，水解反应液中有非水溶性的沉淀产生。对不同时间的水解后产生的沉淀产物进行电泳分析，结果表明不同水解时间的水解产物有所不同，10 h 时沉淀产物中除仍含未水解的利它素

（空心箭头所示）外，在 10 kD 附近始出现一条带；16 h 时沉淀中除未水解的利它素比 10 h 时要减少和 10 kD 处的含量有所增加外，在 40 kD 处隐约可见一多肽带；24 h 时沉淀中除未水解的利它素进一步减少，10 kD 处含量继续增加，40 kD 处出现明显可见一多肽带；36 h 时利它素基本已被水解，10 kD 处含量继续上升，40 kD 处含量又呈下降趋势；水解至 48 h 后只有在 10 kD 附近有一条多肽带（图 4）。

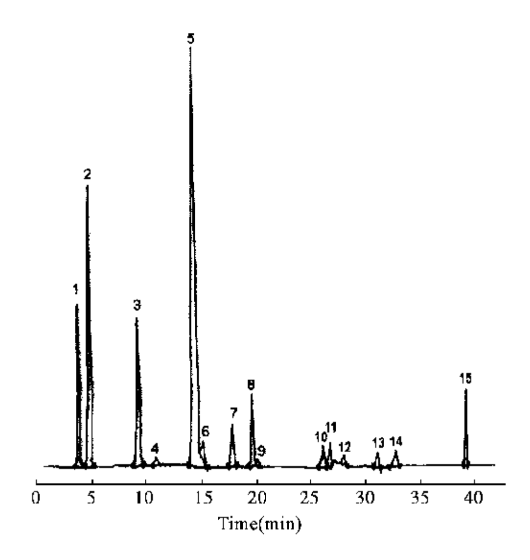


图 2　家蚕利它素氨基酸组成的色谱图

Fig. 2　Chromatogram of the amino acid composition of the kariomone from *B. mori*

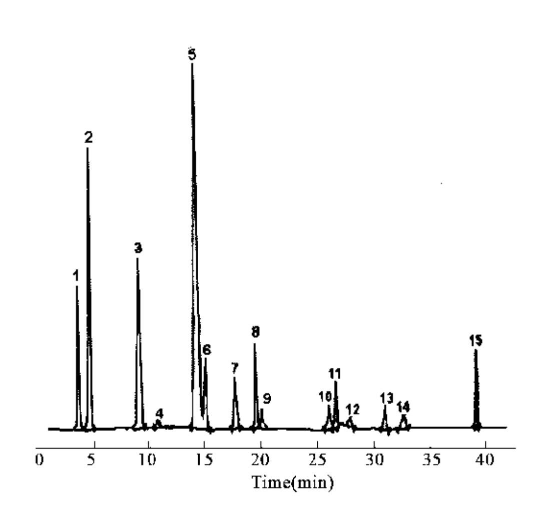


图 3　野蚕利它素氨基酸组成的色谱图

Fig. 3　Chromatogram of the amino acid composition of the kariomone from *T. mandarina*

1. 天冬氨酸 Asp；2. 谷氨酸 Glu；3. 丝氨酸 Ser；4. 组氨酸 His；5. 甘氨酸 Gly；6. 苏氨酸 Thr；7. 精氨酸 Arg；8. 丙氨酸 Ala；9. 酪氨酸 Tyr；10. 甲硫氨酸 Met；11. 缬氨酸 Val；12. 苯丙氨酸 Phe；13. 异亮氨酸 Ile；14. 亮氨酸 Leu；15. 赖氨酸 Lys

表 1　利它素的氨基酸组成

Table 1　The amino acid compositions of the kairomone

氨基酸 Amino acids	克分子数（mol）		克分子百分数（mol %）	
	家蚕 *B. mori*	野蚕 *T. mandarina*	家蚕 *B. mori*	野蚕 *T. mandarina*
甘氨酸 Gly	0.141	0.134	28.1	24.4
谷氨酸 Glu	0.093	0.099	18.5	18.1
天冬氨酸 Asp	0.063	0.055	12.6	10.1
丝氨酸 Ser	0.033	0.039	6.5	7.2
赖氨酸 Lys	0.040	0.037	8.0	6.8
苏氨酸 Thr	0.014	0.029	2.7	5.2
组氨酸 His	0.012	0.016	2.4	3.0
精氨酸 Arg	0.012	0.019	2.4	3.4
丙氨酸 Ala	0.031	0.042	6.2	7.7
缬氨酸 Val	0.010	0.017	2.0	3.1
亮氨酸 Leu	0.013	0.014	2.6	2.5
异亮氨酸 Ile	0.010	0.012	2.0	2.3
酪氨酸 Tyr	0.013	0.017	2.7	3.1
甲硫氨酸 Met	0.012	0.015	2.4	2.7
苯丙氨酸 Phe	0.005	0.003	0.9	0.6

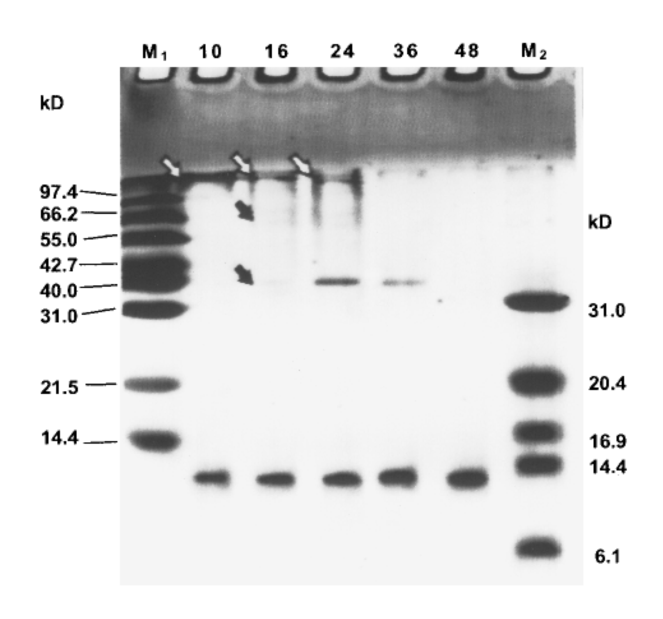


图4 利它素凝胰乳蛋白酶水解不同时间后所产生沉淀的SDS-PAGE图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of the precipitation from kairomone treated with chymotrypsin with different hydrolysis times

M_1，M_2：蛋白质标准 protein markers；10，16，24，36，48：水解时间 hydrolysis time (h)；空箭头 empty arrow：未水解的利它素 unhydrolysated kairomone；实箭头 solid arrow：不完全水解的多肽沉淀 incompletely hydrolysated peptide precipitation

3 讨论

作为常规的蛋白质分离，尤其是制备，对待分离的材料所处的环境通常要求较高。首先是温度，要选择一个既能保证所要分离的蛋白质不被酶所分解，又能保持待分离蛋白的活性或完整性的温度；其次，要有专门的仪器设备，如HPLC、FPLC等。此前作者（高其康和胡萃，1997，2000）对野蚕黑卵蜂寄主识别利它素理化特性的研究结果表明，利它素具有很强的热稳定性，高温对它的生物活性没有明显的影响，但对寄主附腺分泌物中的非利它素蛋白成份影响很大，随着贮存时间的延长，这些干扰利它素分离的非利它素蛋白成份分解较快，而利它素含量仍能维持在较高的水平；低温虽对寄主附腺分泌物中的所有蛋白质都能保证不被分解及相应的生物活性，但对利它素的影响在于能引起利它素发生凝聚沉淀。本文中建立的利它素快速分离方法，充分利用了该利它素的热稳定和低温下产生凝聚这一特性，只需通过简单的离心就能制备大量的利它素，把常规蛋白质分离制备过程，变成非化学的、简单的和无需专门仪器的快速分离过程，而且所获得的利它素纯度高，对野蚕黑卵蜂的引诱活性强。

利它素的氨基酸组成分析结果显示，野蚕黑卵蜂寄主识别利它素是一类非常特殊的蛋白。其特殊性体现在无论是家蚕还是野蚕的利它素分子中均有三种主要氨基酸，它们的克分子百分数之和在整个利它素分子中所占的比例均超过50%。类似的现象在家蚕丝胶蛋白和丝心蛋白中也存在，但这些特殊氨基酸的种类不完全相同（北□舒正，1980；黄君霆，1989）。在利它素中为甘氨酸、谷氨酸和天冬氨酸，在丝心蛋白为甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸，丝胶蛋白为甘氨酸、天冬氨酸和赖氨酸。这给我们很多启发。有关丝心蛋白的研究报道中认为，丝心蛋白的H链包含结晶区域（crystalline region）和无定形区域（amorphous region）。在H链中结晶区域和无定形区域交互排列，每2个结晶区域（每个结晶区域氨基酸残基数为60，分子量约4.1 kD）和2个无定形区域（每个无定形区域氨基酸残基数为49，分子量约3.8 kD）组成1个重复单位，分子量约15.8 kD。用凝胰乳蛋白酶专一性水解丝心蛋白H链，得到沉淀为结晶区域，上清为无定形区域（黄君霆，1989）。据此，我们推测与野蚕黑卵蜂识别寄主有关的利它素蛋白可能存在与丝蛋白类似的化学结构。

受氨基酸组份分析的启发，采用凝胰乳蛋白酶对来自家蚕的利它素进行水解。从不同时间水解后的电泳中给我们这样的启发：由于这利它素分子量大，其相应的空间结构也比较复杂，凝胰乳蛋白酶并不能一次性对所有作用位点同时起作用。首先是对外部裸露位点先进行水解，这时由于裸露位点少且水解酶量足活性高水解充分，电泳中除了未水解的利它素带外，只有10 kD处的多肽带，随着水解的进行，利它素空间结构被打开，但并不是所有疏水性结构，从24 h水解的电泳结果作者从中推测，利它素中还存在40 kD左右的疏水性的亚结构，这亚结构中的凝胰乳蛋白酶作用位点是要待外一层空间结构被酶解后才暴露，最后才被凝胰乳蛋白酶彻底水解，得到10 kD的非水溶性的沉淀（结晶区）。这一发现不仅证实了我们的上述推测，从氨基酸组成上利它素更接近丝胶蛋白。这为我们进一步深入研究利它素蛋白功能和结构提供了可靠的理论依据。

致谢 本研究得到浙江大学生物技术研究所植物病理和生物技术农业部重点开放实验室的大力支持，万分感谢。

参 考 文 献 （References）

Gao Q K, Hu C, 1995. Source and characterization of an egg recognition kairomone of *Telenomus theophilae* Wu *et* Chen. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 21 (4): 583 – 587. [高其康，胡萃，1995. 野蚕黑卵蜂寄主识别利它素的来源和性质. 浙江农业大学学报，21 (4): 583 – 587]

Gao Q K, Hu C, 1997. Factors affecting host recognition and acceptation in the egg parasitoid *Telenomus theophilae* Wu *et* Chen. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 23 (6): 631 – 634. [高其康，胡萃，1997. 野蚕黑卵蜂寄主识别和接受的一些因素. 浙江农业大学学报，23 (6): 631 – 634]

Gao Q K, Hu C, 2000. Influence of temperatures on the activity of host recognition kairomone of *Telenomus theophilae*. *Acta Entomologica Sinica*, 43 (4): 373 – 379. [高其康，胡萃，2000. 温度对野蚕黑卵蜂识别利它素影响. 昆虫学报，43 (4): 373 – 379]

Gao Q K, Hu C, Zhong X C, 1995. Parasitical behavior of *Telenomus theophilae* Wu *et* Chen. *Entomologia Sinica*, 2 (4): 330 – 336.

Huang J T, 1989. Molecular Biology of Silk Protein. Hefei: Anhui Scientech Press. 13 – 25. [黄君霆，1989. 丝蛋白分子生物学. 合肥：安徽科学技术出版社. 13 – 25]

Hu C, Ye G Y, Wang X M, 1992. Investigation on the parasitoids of wild mulberry silkworm. *Acta Phytophylacica Sinica*, 19 (4): 337 – 344. [胡萃，叶恭银，王选民，1992. 江浙野蚕寄生天敌调查及群落结构分析. 植物保护学报，19 (4): 337 – 344]

Nobumasa H, 1980. Structure of Silk Fibre. Ueda: Faculty of Textile Science and Technology of Shinshu University. 335 – 351. [北□舒正，1980. 续绢系の构造. 上田：信州大学织维学部. 335 – 351]